



Kandidaatintutkielma

Telomeerit, senesenssi ja syöpä
Juha Niemelä

Oulun yliopisto
Biokemian ja molekyyli lääketieteen tiedekunta
2021

Sisällysluettelo

Käytetyt lyhenteet	2
1. Lineaariset kromosomit	3
2. Telomeerit	4
3. Telomeerien rakenteet ja niiden tehtävät	5
3.1. Telomeerien DNA	5
3.1.1. G-häntä	7
3.1.2. T-silmukka	8
3.1.3. G-kvadrupleksit	9
3.1.4. R-silmukat ja TERRA	11
3.2. Shelteriini	11
3.3. CST-kompleksi	13
4. Telomeerien pidennys – telomeraasi ja ALT	13
5. Telomeerien tutkimusmenetelmät	17
6. Telomeerit ja ikääntyminen	19
7. Telomeerit ja syöpä	20
7.1. Telomeerit ja telomeerien ylläpitomekanismit syöpähoitojen kohteena	21
Kirjallisuusviitteet	25

Käytetyt lyhenteet

ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
PARP1	Poly ADP-ribose polymerase 1
G4	G-kvadrupleksi
TRF1	Telomeric repeat binding factor 1
TRF2	Telomeric repeat binding factor 2
RAP1	Repressor/activator protein 1
TIN2	TRF1-interacting nuclear factor 2
TPP1	Telomere protection protein 1
POT1	Protection of telomere 1
TERRA	Telomeric repeat containing RNA
ALT	Alternative lengthening of telomeres
OB	Oligonucleotide binding
CST	CTC1, STN1 ja TEN1
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TER	Telomerase RNA-component
TRF	Terminal/telomeric restriction fragment
PCR	Polymerase chain reaction
Q-PCR	Quantitative PCR
STELA	Single telomere length assessment
FISH	Fluorescence in situ hybridization
Q-FISH	Quantitative FISH
PNA-FISH	Peptide nucleic acid FISH
NSCLC	Non small cell lung cancer
LAMP1	Lysosome associated membrane protein 1
APC	Antibody presenting cell
ATRX	Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked

1. Lineaariset kromosomit

Ihmisen kromosomit, kuten muidenkin aitotumallisten eliöiden kromosomit, ovat lineaarisia. Genomin jakaminen useaan lineaariseen kromosomiin on tarpeen, koska eukaryoottien genomit ovat yleensä paljon suurempia kuin prokaryoottien. Suuri genomi yhtenä rengasmaisena kromosomina voisi olla rakenteellisesti epästabiili.

Kromosomien lineaarisuus antaa eukaryoteille suuren evolutiivisen edun; se mahdollistaa meiosisin ja meiosisissa tapahtuvan rekombinaation, mikä luo eukaryoottien geenipooliin paljon diversiteettiä kasvattaen eukaryoottilajien mahdollisuuksia sopeutua erilaisiin olosuhteisiin. Onkin mahdollista, että kromosomien lineaarisuuden rooli meiosisissa on syy sille, että lineaariset kromosomit ovat konservoituneet kaikissa eukaryooteissa siitä huolimatta, että toisin kuin prokaryoottien rengasmaiset kromosomit, lineaariset kromosomit vaativat jatkuvaa ylläpitoa ja siten kuluttavat eliön resursseja (Ishikawa & Naito 1999). Kromosomien lineaarisuudesta seuraa tiettyjä ongelmia, jotka ovat seurausta siitä, että toisin kuin prokaryoottien rengasmaisilla kromosomeilla, lineaarisilla kromosomeilla on päät.

Yksi lineaarisuudesta seuraava ongelma on se, että DNA-katkoksia havaitsevien proteiinien täytyy kyetä erottamaan kromosomin päät DNA-katkoksista. Lineaaristen kromosomien päät täytyy siis piilottaa DNA-korjausmekanismien proteiineilta, jotta ne eivät aiheuta kromosomien päiden fuusioita. Toinen ongelma on kromosomien päiden kopioimisongelma. Yksinkertaistettuna päiden kopioimisongelma on se, että lineaarisen kromosomin päät lyhenevät jokaisella replikaatiokerralla.

Kromosomien päissä sijaitsevat toistojaksoista ja niihin kiinnittyvistä proteiinikomplekseista koostuvat telomeerit ratkaisevat molemmat näistä ongelmista (Smith et al. 2020). Telomeerit ovat keskeisessä roolissa sekä ikääntymisessä, että syövässä; telomeerien replikaatiivinen lyheneminen rajoittaa solujen jakautumista, ja siten aiheuttaa ikääntymiseen liittyvää kudosten uusiutumiskyvyn heikkenemistä, mutta toisaalta se toimii myös syöpää estävänä mekanismina.

2. Telomeerit

Telomeerit koostuvat kromosomien päissä olevista guaniinirikkaista DNA-toistojaksoista ja niihin sitoutuvista proteiinikomplekseista. Ihmisessä telomeerien toistojakso on TTAGGG.

Toistojaksot suojaavat genomia kromosomin päiden lyhenemiseltä toimimalla puskurialueena, jonka lyheneminen ei tuhoa geneettistä materiaalia, koska toistojaksot eivät sisällä geneettistä informaatiota. Telomeerit lyhenevät jokaisella solunjakautumiskerralla. Solu voi siis jakautua vain rajallisesti ennen kuin lyheneminen alkaisi tuhoamaan genomia, ellei solussa ole aktiivista mekanismia, joka lisää telomeereihin toistojaksoja. Ihmisen somaattisissa soluissa tällaista mekanismia ei ole, mutta ituradan soluissa ja joissain kantasoluissa ekspressoidaan tätä tarkoitusta varten telomeraasi-nimistä entsyymiä. Soluissa, joissa ekspressoidaan telomeraasia, telomeerit eivät lyhene, tai ne lyhenevät hitaammin. Telomeraasi on ribonukleoproteiini, joka syntetisoi telomeereihin lisää toistojaksoja käyttäen templaattina telomeerien toistojaksoa vastaavaa RNA-juostetta.

Kun solu on jakautunut niin monta kertaa, että telomeeri on kulunut kriittisen lyhyeksi, se on saavuttanut *Hayflickin rajansa*, jolloin solu joko menee senesenssiin tai kuolee. Senesenssi tarkoittaa sitä, että solu on pysyvästi keskeyttänyt solusyklin, eli se ei enää jakaudu tai kasva. Joskus solu, jonka telomeerit ovat kriittisen lyhyitä, jatkaakin jakautumista, mikä johtaa telomeerikriisiin, jossa telomeerit tuhoutuvat ja genomi muuttuu epästabiiliksi. Telomeerikriisi johtaa useimmiten solun kuolemaan, mutta kromosomifuusiot voivat aiheuttaa myös onkogeenisia muutoksia.

Iän myötä telomeerit lyhenevät ja senesenttien solujen osuus kudoksissa kasvaa, mikä nykykäsityksen mukaan on yksi mekanismeista ikääntymisen taustalla. Ihmisessä ja muissa eläimissä, joissa telomeerit ovat lyhyet ja joiden somaattisissa soluissa ei ekspressoida telomeraasia, replikaatiivinen senesenssi toimii suojana syövän syntymistä vastaan, sillä hallitsemattomasti jakautuvan somaattisen solun telomeerit kuluvat nopeasti loppuun. Telomeraasin ekspressio on yleinen piirre syöpäsoluissa, ja telomeraasin aktiivisuuteen vaikuttavat lääkkeet toimivat hoitona syöpää vastaan.

Telomeerien DNA:ssa esiintyy eri sekundaari- ja tertiäärirakenteita, kuten T- ja D-silmukat, G-quadrupleksit, sekä R-silmukat. Tärkein telomeerien rakenteessa mukana oleva proteiinikompleksi on shelteriini, joka ihmisessä koostuu kuudesta eri proteiinista. T-silmukka

yhdessä shelteriinin kanssa piilottaa DNA-juosteen pään DNA-katkoksia havaitsevilta ATM- ja ATR-kinaaseilta, sekä PARP1:lta (de Lange 2018).

Koska telomeerien ylläpito on keskeisessä roolissa solunjakautumisen rajoittamisessa, telomeerien eri rakenteet sekä telomeraasi ovat houkuttelevia tutkimuskohteita syöpähoitojen näkökulmasta. Vaikka telomeereihin ja telomeraasiin kohdistuvia lääkkeitä on kehitetty jo vuosikymmeniä, yksikään niistä ei ole vielä edennyt kliinisiä kokeita pidemmälle. Telomeereihin liittyy vielä paljon tuntematonta, ja tutkittavaa riittää.

3. Telomeerien rakenteet ja niiden tehtävät

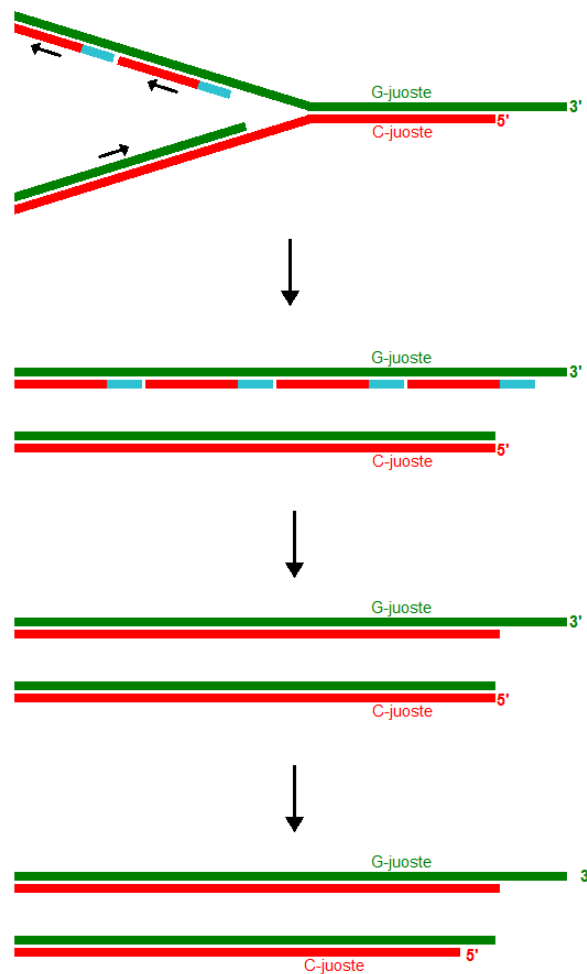
Telomeerien tärkeimmät tehtävät ovat genomisen DNA:n suojaaminen kromosomin päiden lyhenemiseltä, kromosomin päiden suojaaminen DNA-vaurioiden korjausmekanismeilta, sekä tehtävät kromosomien organisoinnissa meioosin aikana. Näiden ongelmien ratkaisuksi telomeereistä on kehittynyt proteiineista ja DNA:n erilaisista sekundäärirakenteista muodostuvia komplekseja. Telomeerien replikaatio on esitetty kuvassa 1, ja telomeerien replikaatiivinen lyheneminen kuvassa 2.

3.1. Telomeerien DNA

Telomeerien toistojaksojen tehtävä genomien suojana on itsestäänselvä; telomeerien eikoodaava DNA toimii puskurina, jotta kromosomin päiden lyheneminen ei tuhoa geneettistä materiaalia. Lyhyet telomeerit, kuten ihmisen telomeerit (10-15 kb), toimivat somaattisissa kudoksissa jakautumisen rajoittajana siten, että telomeerien kuluttua loppuun, solu lopettaa jakautumisen. Monet syövät kiertävät tämän mekanismin siten, että telomeraasin ekspressio on niissä lisääntynyt (Smith et al. 2020). Telomeerien pituus voi vaikuttaa geenien ekspressioon siten, että pitkä telomeeri voi taipua lähelle genomista DNA:ta, ja mahdollistaa siten sen, että shelteriinin proteiinit osallistuvat geenien säätelyyn (Shay 2018).

Telomeerien toistojakson sekvenssi vaihtelee eri taksonomisten ryhmien välillä, mutta yhteistä on se, että toisen juosteen toistojakso sisältää runsaasti guaniinia, ja toisen juosteen vastaavasti sytosiinia. Telomeerien runsaan guaniinipitoisuuden takia telomeerit ovat erityisen alttiita

oksidatiivisille vaurioille, sillä guaniini hapettuu DNA:n emäksistä helpoiten. Happiradikaalien aiheuttama oksidatiivinen telomeerien lyheneminen on pään replikaatiivisen lyhenemisen ohella toinen merkittävä telomeerien lyhenemisen mekanismi. Telomeerien runsas guaniinin määrä vaikuttaakin hieman omituiselta, sillä vähemmän guaniinia sisältävä telomeeri olisi vähemmän altis oksidatiiviselle stressille. Mahdolliseksi selitykseksi telomeerin suurelle guaniinin määrälle on esitetty, että guaniinirikkaiden telomeerien oksidatiiviset vauriot voisivat mahdollisesti toimia varoituksena oksidatiivisesta stressistä ja signaloida solulle, että sen tulisi reagoida oksidatiiviseen stressiin ennen kuin genomi vauroituu (Blackburn et al. 2015).



Kuva 1: Telomeerien replikaatio

Replisomi kulkee telomeerin läpi normaalisti, eli toinen syntetisoitava juoste syntetisoidaan yhtenä kappaleena jatkuvasti, ja toinen syntetisoidaan osissa Okazakin fragmentteina. Okazakin fragmentteina syntetisoidusta juosteesta tulee vastinjuostettaan lyhyempi koska viimeisen fragmentin RNA-aluke ei kiinnity aivan kromosomin päähän. Kromosomien toiseen päähän muodostuu näin G-häntä. "Tylppien" kromosomien päät prosessoidaan G-hänniksi poistamalla päästä osa C-juostetta.

Telomeerien guaniinipitoisuudesta seuraa myös G-quadrupleksiksi (G4) kutsuttujen sekundäärirakenteiden muodostuminen telomeerien yksijuosteisiin osiin. Syöpähoitojen kehittämisen kannalta G4-rakenteisiin vaikuttavat molekyylit ovat lupaava tutkimuskohde kahdesta eri syystä: G4-rakenteiden on havaittu inhiboivan telomeraasin toimintaa, ja useilla G4-rakenteita stabiloivilla molekyyleillä onkin havaittu olevan antiproliferatiivisia vaikutuksia syöpäsoluihin, ja toisaalta G4:jiä hajottavat molekyylit lyhentävät syöpäsolujen telomeereja (Yu et al. 2019).

Telomeereistä puhuttaessa runsaasti guaniinia sisältävää 3'-juostetta kutsutaan G-juosteeksi, ja sen vastinjuostetta vastaavasti C-juosteeksi. Ihmisessä, kuten muissakin selkärangaisissa, G-juosteen sekvenssi on TTAGGG_n, ja C-juosteen sekvenssi vastaavasti CCCTAA_n. G-juoste on hieman pidempi kuin C-juoste, eli telomeerin päässä on yksijuosteinen G-häntä. G-hännän pituus vaihtelee eri lajeissa, eri solutyypeissä, sekä samassa solulinjassa eri ajanjaksoina.

3.1.1. G-häntä

Kromosomin kopioituessa alkuperäisen G-juosteen vastijuoste (lagging-juoste) syntetisoidaan Okazakin fragmentteina, ja vastinjuoste jää lyhyemmäksi kuin G-juoste, koska DNA-polymeraasi tarvitsee synteetin aloittamiseen RNA-alukkeen. On havaittu, että viimeinen RNA-aluke sitoutuu noin 70-100 emäsparin päähän telomeerin päästä, eli replikaatiossa syntyvä uusi C-juoste on 70-100 emästä lyhyempi kuin alkuperäisen kromosomin G-juoste (Chow et al. 2012). Lagging-telomeereihin syntyy siis luonnostaan yksijuosteinen G-häntä RNA-alukkeen sijoittumisen vuoksi, tosin G-hännän pituutta säädelletään vielä C-juosteen pituutta muuttamalla. Viimeisen RNA-alukkeen sijoittuminen vaikuttaisi on suuri telomeerien replikaatiivisen lyhenemisen taustalla vaikuttava tekijä, mutta löytyy todistusaineistoa sille, että on olemassa telomeraasista riippumaton mekanismi, joka pidentää C-juosteita lagging-juosteisissa telomeereissä, mikä lieventäisi RNA-alukkeen sitoutumiskohdasta riippuvaa telomeerien lyhenemistä (Dai et al. 2012).

Telomeerin leading-juoste syntetisoidaan yhtenä kappaleena, eli telomeerin päästä tulee "tylppä", eli G- ja C-juosteet ovat yhtä pitkiä. Yksijuosteinen G-häntä on telomeerin päätä suojaavan T-silmukkarakenteen muodostumiselle oleellinen, minkä takia tylpän telomeerin C-juostetta täytyy lyhentää G-hännän muodostamiseksi. Suurin osa telomeerien C-juosteista

päättyy CCAATC-sekvenssiin, mikä viittaa siihen, että C-juosteiden prosessointi on spesifistä tälle sekvenssille (Sfeir et al. 2005). Lagging-telomeereissä G-hännät ovat pidempiä, kuin leading-telomeereissä (Chai et al. 2006).



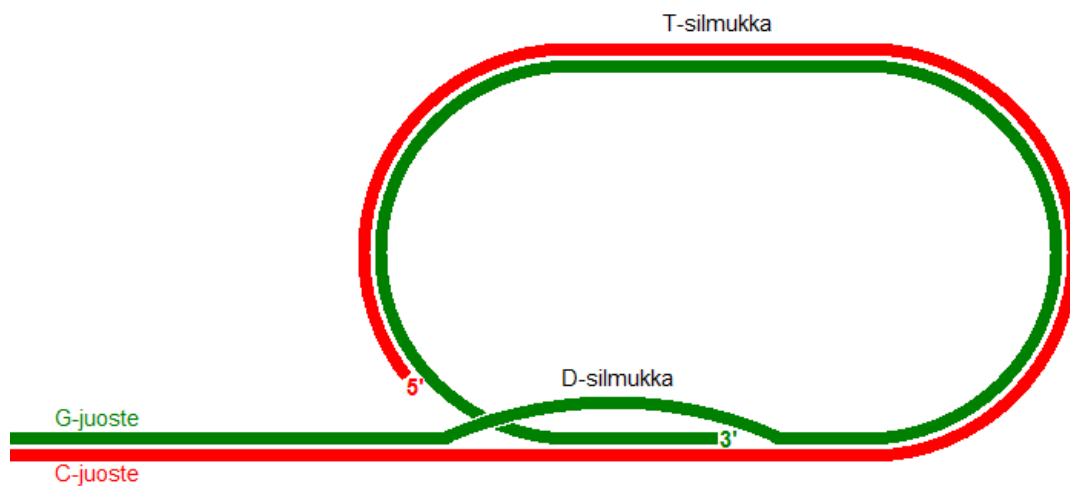
Kuva 2: Telomeerien replikatiivinen lyheneminen yksinkertaistettuna

- 1) Kromosomin replikoituessa kumpikin alkuperäinen juoste lyhenee 5'-päästä, ts. C-juoste lyhenee, koska sen vastinjuoste syntetisoidaan yhtenä kappaleena, jolloin telomeerin päästä tulee "tylppä". Tylpät telomeerin päät prosessoidaan G-hänniksi lyhentämällä C-juostetta.
- 2) Uudet juosteet jäävät 5'-päistä vastinjuosettaan lyhyemmiksi, koska viimeisen Okazakin fragmentin aloittava aluke kiinnittyy 70-100 nukleotidia telomeerin päästä.

3.1.2. T-silmukka

Telomeerien päät täytyy piilottaa DNA-katkoksia havaitsevilta mekanismeilta, jotta niitä ei virheellisesti kohdeltaisi DNA-katkoksina. Tämän tehtävän kannalta tärkein telomeerien DNA-sekundäärirakenne on T-silmukka. T-silmukka muodostuu siten, että G-häntä syrjäyttää osan G-juosteesta telomeerin kaksijuosteisessa osassa. T-silmukan koko vaihtelee suuresti, ja silmukan koolla ei ole havaittu olevan biologista merkitystä. Syrjäytetyn G-juosteen muodostamaa yksijuosteista rakennetta kutsutaan D-silmukaksi. T-silmukan rakenne on esitetty kuvassa 3.

T-silmukan rakenteessa, niinkin muuallakin telomeerissä, on mukana shelteriinikomplekseja. T-silmukka ja shelteriini yhdessä suojaavat telomeerien päitä DNA-katkoksia havaitsevilta proteiineilta. TRF2, yksi shelteriinin alayksiköistä, toimii myös T-silmukan muodostajana, ja se kykenee muodostamaan T-silmukoita jopa olosuhteissa, joissa muita shelteriinin alayksiköitä ei ole lainkaan (Timashev & de Lange 2020). TRF2 myös suojaa T-silmukkaa dHJ-risteyksiltä, jotka voisivat aiheuttaa sen, että T-silmukka irtoaa kromosomista T-renkaana aiheuttaen suuria telomeerideleetioita (de Lange 2018).



Kuva 3: T-silmukan (ja D-silmukan) rakenne

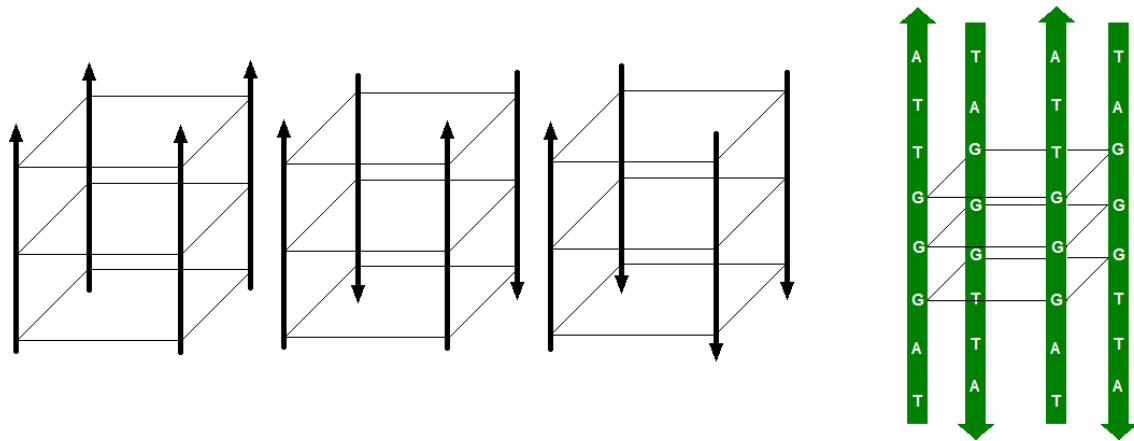
T-silmukka muodostuu siten, että yksijuosteinen G-häntä syrjäyttää osan G-juosteesta ja pariutuu C-juosteen kanssa. Syrjäytetyn G-juosteen osan muodostamaa silmukkaa kutsutaan D-silmukaksi.

3.1.3. G-kvadrupleksit

G4:t eli G-kvadrupleksit ovat yksijuosteisissa, runsaasti guaniinia sisältävissä nukeliinihapoissa muodostuvia sekundäärirakenteita. G-kvadruplekseja muodostuu runsaasti erityisesti telomeerien G-hännässä. Telomeerien G4:t muodostuvat siten, että neljän TTAGGG-sekvenssin guaniinit muodostavat keskenään vetysidoksia muodostaen kolme päällekkäistä neliönmuotoista tasoa. G-kvadrupleksien keskellä on rakennetta stabiloiva kationi, kuten K⁺ tai Na⁺. G-kvadrupleksin rakenne on esitetty kuvassa 4.

G-kvadruplekseja on telomeerien lisäksi myös genomisessa DNA:ssa. Niillä vaikuttaa olevan replikaatioon, transkriptioon, translaatioon, mRNA-silmukointiin ja epigenomin säätelyyn liittyviä tehtäviä. G-kvadruplekseja muodostuu myös TERRA-RNA-juosteissa, millä on merkitystä interferonien säätelemien geenien repressoinnissa (Nakahishi & Seimiya 2020).

G4:t haittaavat sekä replisomin kulkemista, että telomeraasin toimintaa. FANCI on helikaasi, joka ihmisessä purkaa G-kvadruplekseja, ja on siten erityisen tärkeä telomeerien ylläpidossa (Wu et al. 2008).



Kuva 4: G-kvadrupleksin rakenne

G4 muodostuu neljästä toisiinsa sitoutuvasta runsaasti guaniinia sisältävästä sekvenssistä.

Guaniinit muodostavat keskenään Hoogsten-vetysidoksia, ja asettuvat päällekkäisiin neliönmuotoisiin tasoihin. Juosteet voivat kulkea toisiinsa nähden samansuuntaisesti tai vastakkaisiin suuntiin.

Telomeerien G-kvadrupleksit ovat otollinen kohde syöpähoitojen kohteeksi. G-kvadruplekseja muodostuu eniten solusyklin S-faasissa (Biffi et al. 2013), eli syöpäsolujen nopean jakautumisen takia G-kvadruplekseja on syöpäsoluissa useammin kuin terveissä soluissa. Telomeerejä voidaan lyhentää joko hajottamalla G-kvadruplekseja, tai stabiloimalla niitä. G4:t ovat yleisimpiä telomeereissä, minkä takia G-kvadruplekseja hajottavat molekyylit lyhentävät tehokkaasti telomeerejä (Yu et al. 2019), ja G4:t häiritsevät telomeerien replikaatiota ja pidennystä, minkä takia G4:ien stabilointi inhiboi telomeerien replikaatiota (Asamitsu et al. 2019).

3.1.4. R-silmukat ja TERRA

R-silmukat ovat kolmijuosteisia DNA-RNA-hybridirakenteita, joissa RNA-juoste syrjäyttää toisen DNA-juosteen, ja pariutuu toisen kanssa. R-silmukat ovat yleisiä telomeereissä. Telomeereissä RNA-komponenttina toimii TERRA, eli telomeerien toistojaksoja vastaava RNA. R-silmukat vaikeuttavat replisomin kulkemista kromosomia pitkin, ja aiheuttavat transkriptio- ja replikaatiomekanismien yhteentörmäyksiä, joilla voi olla tuhoisia vaikutuksia kromosomille (Crossley et al. 2019). Lyhyissä telomeereissä TERRA ja R-silmukat voivat toimia homologiaan perustuvan DNA-korjauksen toimintaa edistävinä tekijöinä, ja TERRA onkin homologiaan perustuvaa ALT-mekanismia käyttävissä soluissa runsasta (Graf et al. 2017).

3.2. Shelteriini

Ihmissoluissa DNA-katkosten havaitsemisessa tärkeitä proteiineja ovat ATM- ja ATR-kinaasit ja PARP1. Ilman T-silmukkaa ja shelteriiniksi kutsuttua proteiini-kompleksia ATM, ATR ja PARP1 tunnistaisivat kromosomin päät DNA-katkoksiksi, mikä johtaisi siihen, että DNA-katkosten korjausmekanismit liittäisivät kromosomien päitä toisiinsa (de Lange 2018). Kromosomifuusiot aiheuttavat geneettistä epästabiiliutta, mikä johtaa todennäköisesti solun kuolemaan.

Telomeerien silmukkarakenne yhdessä shelteriinin kanssa suojaa kromosomien päitä estämällä ATM- ja ATR-kinaaseja, sekä PARP1:tä havaitsemasta telomeerin päätä. Shelteriinin sitoutuminen on spesifinen telomeerien nukleotidisekvenssille, mikä estää sitä häiritsemästä DNA:n korjausmekanismeja tilanteessa, jossa kromosomi on vaurioitunut. Shelteriiniä tarvitaan myös telomeerien pituuden ylläpidossa, sillä shelteriini toimii telomeraasin sitoutumisalustana. Telomeraasin riippuvuus shelteriinistä estää telomeraasia syntetisoimasta TTAGGG-jaksoja DNA-katkoksiin ei-telomeerisessä osassa kromosomia.

Shelteriinin proteiineilla on DNA-katkosten korjausmekanismien kiertämisen lisäksi useita tehtäviä liittyen telomeraasin säätelyyn ja senesenssiin. Ihmisen shelteriini on kuudesta proteiinista (TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1, ja POT1) koostuva kompleksi, jolla on tärkeitä

tehtäviä telomeerien suojaamisessa, ylläpidossa, ja signaloinnissa. Taulukossa 1 on lueteltuna shelteriinin alayksiköiden tehtävät.

Shelteriinikompleksi kiinnittyy telomeerien DNA:han TRF1- ja TRF2-homodimeerien, sekä POT1:n avulla. TRF1 ja TRF2 sisältävät TRFH-dimerisaatiodomeenin, jonka avulla ne dimerisoituvat. Myös TIN2 sisältää TRFH:ta muistuttavan domeenin, vaikka onkin monomeeri. Shelteriini sitoutuu dsDNA:han käyttäen TRF1 ja TRF2 sisältämiä kolmesta alfaheliksistä koostuvia Myb-domeeneja. Koska TRF1 ja TRF2 ovat dimeerejä ja kukin alayksikkö sisältää Myb-domeenin, yksi shelteriinikompleksi sisältää neljä dsDNA-sitoutumiskohtaa. Myös RAP1 sisältää Myb-domeenin, mutta sillä ei ole DNA-sitoutumisaktiivisuutta. Yksijuosteiseen telomeerien DNA:han shelteriini sitoutuu POT1:n OB-laskoksen avulla. POT1 sitoutuu TPP1:een, ja TIN2 sitoo koko kompleksin yhteen sitoutumalla sekä TRF1:een, TRF2:een, että TPP1:een. RAP1 sitoutuu TRF2:een. DNA-vaurioiden havaitsemismekanismien inhiboimisen lisäksi shelteriini toimii telomeerien pituuden säätelyssä, G-hännän pituuden säätelyssä, sekä helpottaa replikaatiohaarukan etenemistä telomeeriä pitkin (de Lange 2018).

Taulukko 1: Shelteriinin alayksiköiden roolit shelteriinin rakenteessa ja toiminnassa
(Taulukon tiedot ovat peräisin lähteestä Turner et al. 2019)

shelteriinin alayksikkö	rakenteellinen rooli	tehtävät
TRF1	sitoutuu telomeerien kaksijuosteiseen DNA:han	säätlee telomeerien pituutta
TRF2	sitoutuu telomeerien kaksijuosteiseen DNA:han	stabiloi T-silmukkaa ja säätlee telomeerien pituutta
RAP1	sitoutuu TRF2:een	säätlee telomeerien pituutta
TIN2	sitoo yhteen TRF1:n, TRF2:n ja TPP1:n	sitoo shelteriinikompleksin yhteen
TPP1	sitoutuu TIN2:een ja POT1:een	auttaa POT1:tä sitoutumaan telomeerien yksijuosteiseen osaan, säätlee telomeerien pituutta yhdessä POT1:n kanssa
POT1	sitoutuu telomeerien yksijuosteiseen DNA:han	inhiboi DNA-vauriosignaalointia ja säätlee telomeerien pituutta

3.3. CST-kompleksi

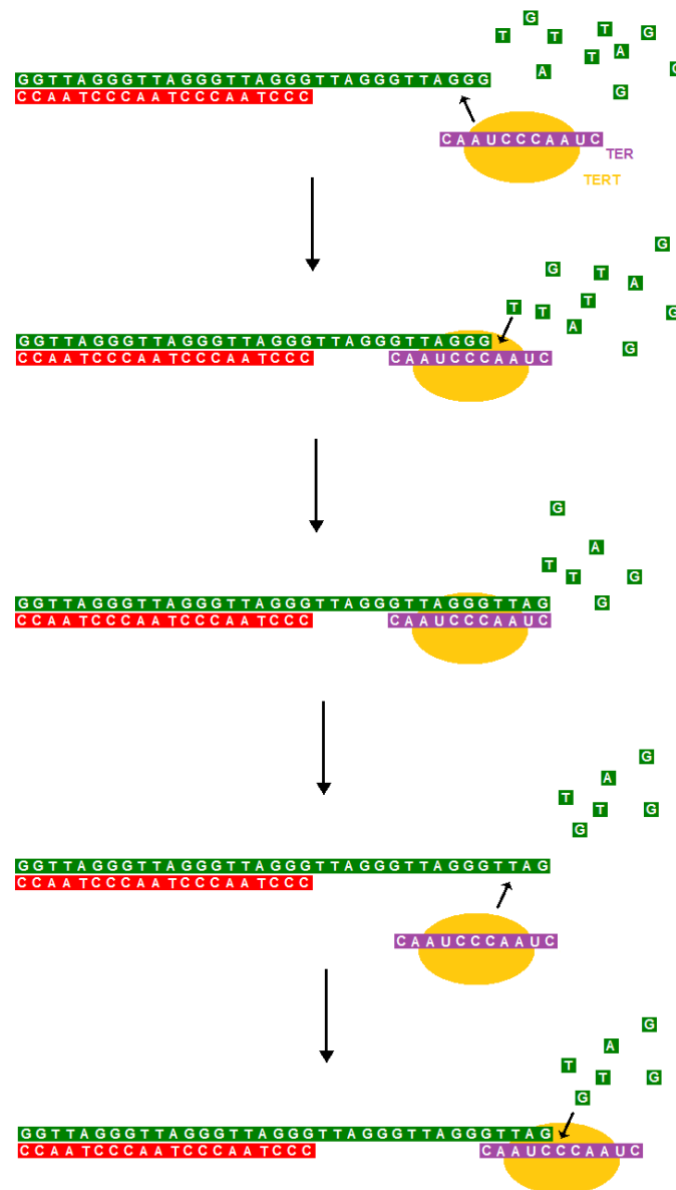
CST-kompleksi on hiivassa shelteriiniä vastaava telomeerien rakenteessa mukana oleva proteiini-kompleksi, jonka toiminta ihmisen telomeereissa on verrattain uusi havainto. CST koostuu kolmesta alayksiköstä: CTC1:stä, STN1:stä ja TEN1:stä. Hiivassa CST hoitaa hyvin samankaltaisia tehtäviä kuin shelteriini, mutta ihmisessä CST ei ole telomeerien päiden suojaamisen kannalta tärkeä (Price et al. 2010). CST toimii ihmisessä telomeraasin säätelijänä ihnnhiboimalla telomeraasin sitoutumista shelteriiniin (Chen et al. 2012), ja sillä on oleellinen rooli telomeerien C-juosteen täydennyssynteetissä (Feng et al. 2017).

4. Telomeerien pidennys - Telomeraasi ja ALT

Eukaryooteissa telomeerien pituuden ylläpitäminen on edellytys solun rajattomalle jakautumiselle. Useimmissa eukaryooteissa tärkein ylläpitomekanismi on telomeraasin aikaansaama toistojaksojen synteesi telomeerien G-hännän päähän, ja sitä seuraava C-juosteen täydennyssynteesi. Telomeraasi on ribonukleoproteiini, jonka käänteikopioija-alayksikkö TERT syntetisoi telomeerien G-juosteiden päihin lisää toistojaksoja käyttäen TER:iä, eli telomeraasikompleksin RNA:sta koostuvaa komponenttia templaattina. TER:n sisältämä templaatti pariutuu osittain G-hännän pään kanssa niin, että templaatin pää jää yksijuosteiseksi. TERT syntetisoi yksijuosteisen templaatin vastinjuosteeksi G-hännän päähän lisää TTAGGG-toistojaksoja. Templaatin tultua täyteen, TER siirtyy taas G-hännän päähän niin, että osa jää parittomaksi (Wang & Feigon 2017). Telomeraasin toiminta on esitettyä yksinkertaistettuna kuvassa 5. Koska telomeraasi syntetisoi vain G-juostetta, DNA-polymeraasi täyttää telomeerien C-juosteen Okazakin fragmentteina, ja viimeisen RNA-alukkeen poston seurauksena C-juoste jää lyhyemmäksi kuin G-juoste, mikä muodostaa yksijuosteisen G-hännän (samalla tavalla kuin kuvassa 1 esitettyssä uuden C-juosteen synteetissä).

Telomeraasin ekspressio somattisissa soluissa vaihtelee eri lajien kesken. Useimmissa suurissa ja pitkäikäisissä eläimissä, kuten ihmisessä, telomeraasia ekspressoidaan huomattavasti vain ituradan soluissa ja joissain kantasoluissa. Pienissä ja lyhytikäisissä eläimissä, kuten hiirissä, telomeraasia ekspressoidaan kaikissa soluissa. Pienikokoisessa eläimessä on pienempi määrä soluja (eli myös pienempi määrä potentiaalisia syöväksi kehittyviä soluja), ja lyhytikäinen eläin

menehtyy todennäköisesti muista syistä ennen kuin syöpä ehtii kehittyä. Ihmisen kaltaisissa suurissa ja pitkäikäisissä eläimissä telomeraasin repressio somaattisissa soluissa tarvitaan pienentämään syöpäriskiä (Gorbunova & Seluanov 2009).

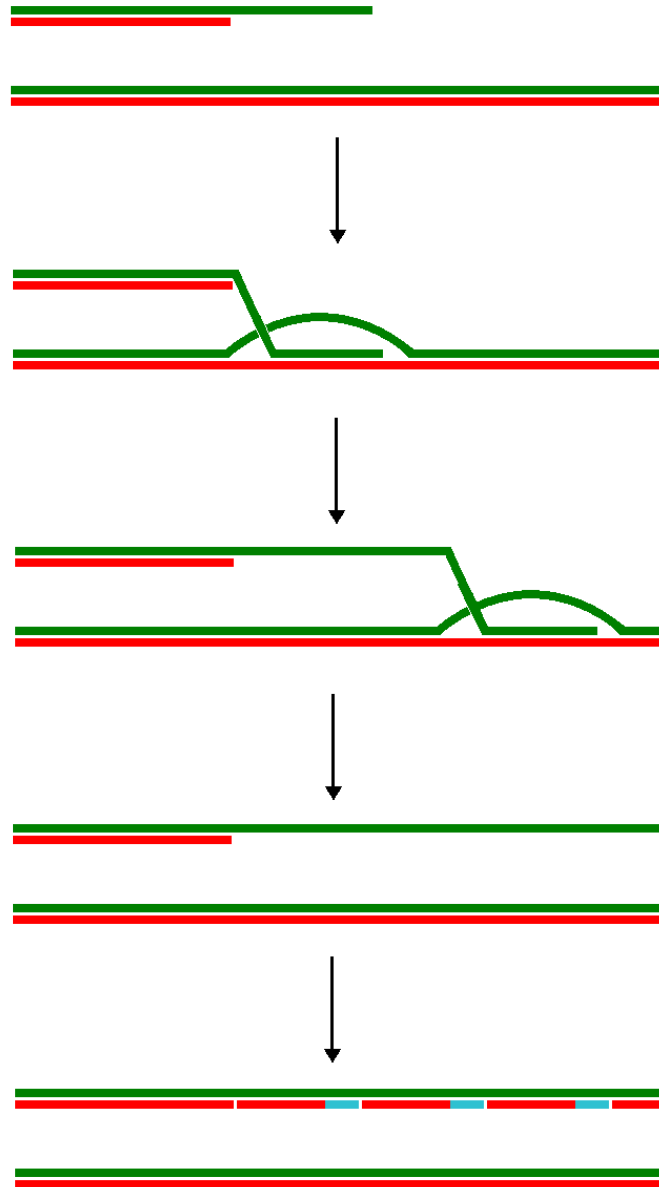


Kuva 5: Telomeerien pidennys telomeraasilla

Telomeraasi kiinnittyy G-häntään siten, että osa TER:stä, eli telomeraasin RNA-komponentista, pariutuu G-hännän nukleotidien kanssa. Osa TER:stä toimii telomeraasin kiinnittymiskohtana telomeeriin, ja osa toimii templaattina, kun telomeraasin käänteiskopioijaosa TERT polymerisoi G-hännän päähän lisää toistojaksoja. Kun nukleotideja on kiinnittynyt niin monta, että TER-templaatti on täynnä, TER siirtyy taas G-hännän päähän ja synteesi voi jatkua.

TERT muodostuu kämmen, peukalo, ja sormidomeeneista, jotka muistuttavat rakenteeltaan retrovirusten käänteiskopioijien domeeneja (Ngyen et al. 2018). TERT:n ekspression säätely on telomeraasin aktiivisuuden tärkein säätelykohta. TER sisältää telomeerien toistojaksojen templaattisekvenssin, mutta se sisältää myös paljon muuta, ja sen rakenteella on telomeraasin toiminnan kannalta muitakin tehtäviä. Useat TER:n sisältämät rakenteet osallistuvat telomeraasin rakenteeseen ja toimintaan, ja siten vaikuttavat telomeraasin aktiivisuuteen. TER:n eri rakenteet toimivat myös sitoutumisalustana useille telomeraasin kanssa vuorovaikuttaville proteiineille. Tärkeitä rakenteita TER:ssä ovat templaatti-pseudoknot rakenne, CR4/5 domeeni, ja H/ACA-rakenne. Templaatti toimii itsestäänselvästi telomeerien synteesissä templaattijuosteena, ja templaatin jälkeinen TBE-elementti pysäyttää synteesin, estäen sen, että TERT syntetisoisi telomeereihin muuta, kuin templaattia vastaavaa sekvenssiä. CR4/5 domeeni on TERT:n sitoutumiskohta. H/ACA toimii sitoutumisalustana useille telomeraasin kanssa vuorovaikuttaville proteiineille (Smith et. al. 2020).

Suurimassa osassa syövästä telomeerien replikaatiivinen lyheneminen kierretään telomeraasin avulla, mutta osassa syövästä telomeraasia ei tarvita, vaan niissä toimii telomeraasista riippumaton ALT-mekanismi. ALT perustuu telomeerien homologiseen rekombinaatioon. Telomeerien rekombinaatiota voi tapahtua sekä eri telomeerien välillä, että telomeerin ja ekstrakromosomaalisen telomeerimaisen DNA:n välillä. Telomeerien pidennysmekanismina se voi toimia siten, että pidennettävän telomeerin G-häntää pidennetään käyttäen synteesissä vastinjuosteena toisen telomeerin C-juostetta. Pidennettävän telomeerin C-juoste täydennetään lopulta Okazakin fragmentteina. Rekombinaation ei välttämättä tarvitse tapahtua toisen kromosomin telomeerin kanssa, vaan sitä voi tapahtua myös ekstrakromosomaalisten telomeeritoistojaksoista koostuvien DNA-renkaiden kanssa. Telomeerien pidennys ALT-mekanismilla on esitetty kuvassa 6. Telomeerirenkaat, tai T-renkaat, ovat telomeerien toistojaksoista koostuvia, useimmiten kaksijuosteisia DNA-renkaita, ja C-renkaat ovat yksijuosteisia, telomeerien C-juostetta vastaavia renkaita. Erityisesti C-renkaat ovat runsaita ALT-positiivissa soluissa. Jotta telomeereihin vaikuttavia potentiaalisia syöpähoitoja voitaisiin soveltaa tehokkaasti, syövän ALT-positiivisuuden tunnistaminen on oleellista, ja C-renkaiden runsaus voikin olla hyödyllinen markkeri syövän ALT-aktiivisuudesta (Cesare & Reddel 2010).



Kuva 6: Telomeerien pidennys ALT-mekanismilla

ALT-mekanismissa telomeereja pidennetään pidentämällä G-häntää käyttäen vastinjuosteena toisen telomeerin C-juostetta. Pidennettävän telomeerin C-juoste täydennetään lopulta Okazakin fragmentteina.

Synteesin vastinjuosteena voi toimia toisen kromosomin telomeerin sijasta myös kromosomien ulkopuolinen CCCTAA-toistojaksoista koostuva DNA-juoste.

5. Telomeerien tutkimusmenetelmät

Telomeerien pituuden selvittämiseen ja vertailuun käytetään useita eri menetelmiä. Kullakin menetelmällä on etuja ja heikkouksia, ja kaikki menetelmät eivät sovellu kaikissa tilanteissa.

Eri menetelmillä saadut tulokset eivät välttämättä ole keskenään vertailukelpoisia.

TRF (terminal/telomeric restriction fragmentation) telomeerien tutkimusmenetelmänä perustuu siihen, että ei-telomeerinen DNA voidaan pilkkoa restriktioentsyymeillä pilkkomatta telomeerejä. Restriktioentsyymeitä täytyy olla useita erilaisia, jotta genominen DNA pilkkoutuu tarpeeksi, ja restriktiosekvenssien täytyy olla sellaisia, että niitä ei löydy telomeerien toistojaksoista. Telomeerien pituuksia voidaan analysoida pilkkomisen jälkeen southern blot -menetelmällä. DNA:n satunnaisen hajoamisen välttäminen on oleellista tulosten luotettavuuden kannalta, sillä DNA:n hajoaminen vääristää tuloksia. TRF-analyysin yksi heikkous on se, että siihen tarvitaan suuri määrä DNA:ta (Montpetit et al. 2014).

Pienemmillä DNA-määrillä telomeerejä tutkittaessa täytyy hyödyntää PCR-pohjaisia menetelmiä. Telomeerejä monistaessa PCR:llä on otettava huomioon se, että TTAGGG-sekvenssiä täydellisesti vastaava aluke olisi AATCCC-sekvenssiä vastaavan alukkeen vastinjuoste. Tämä aiheuttaisi sen, että PCR:n lopputuotteena olisi pääosin alukedimeereistä muodostuneita lyhyitä fragmentteja. Telomeereja monistettaessa alukkeet täytyykin suunnitella niin, että ne eivät vastaa telomeerien sekvenssejä täydellisesti, mutta sitoutuvat silti telomeereihin halutulla tavalla.

Q-PCR (quantitative PCR, tunnetaan myös nimellä RT-PCR tai real time PCR) on PCR-menetelmä, jossa polymeerasiketjureaktion edistymistä voidaan seurata reaaliajassa fluoresoivia molekyyliä käyttäen. SYBR-menetelmässä fluoroforina käytetään molekyyliä, joka fluoresoi voimakkaasti sitoutuneena kaksijuosteiseen DNA:han. Q-PCR toimii telomeerien pituuden analysointimenetelmänä siten, että verrokiksi Q-PCR:llä monistetaan toisessa putkessa jotain vain yhdessä lokuksessa sijaitsevaa geeniä. Telomeerien ja referenssigeenin fluoresenssisignaalien suhde on verrannollinen telomeerien pituuksien keskiarvoon. Yksi Q-PCR:n heikkous on se, että lyhyimpien telomeerien pituudesta se ei tuota tietoa. Toinen heikkous on se, että Q-PCR:n kannalta on oleellista, että tutkittavat solut ovat karyotyypillisesti normaaleja. Poikkeamat referenssigeenin lukumäärässä tekevät tuloksista epäluotettavia, minkä takia Q-PCR ei välttämättä sovellu syöpäsolujen telomeerien analysointiin (Montpetit et al. 2014).

STELA (single telomere length assesment) on toinen PCR:ään perustuva telomeerien pituuden analysointimenetelmä. STELAssa vain tietyn kromosomin telomeeria monistetaan hyödyntäen kyseiselle kromosomille spesifistä telomeerin lähellä olevaa sekvenssiä ja sitä vastaavaa aluketta. STELA toimii vain osalla kromosomeista, koska kaikissa kromosomeissa ei ole tarpeeksi spesifistä sekvenssiä. Universal STELA on kaikille kromosomeille soveltuva STELA-menetelmä. Universal STELAssa telomeerit irrotetaan muusta kromosomista restriktioentsyymeillä, ja intragenomisen DNA:n monistuminen PCR:ssä estetään muodostamalla termostabiili panhandle-silmukka kromosomin intragenomisen osan päihin. Telomeerien monistamisessa käytetään hyväksi G-häntää ja telomeerin lähellä sijaitsevaa kromosomispesifistä sekvenssiä (Montpetit et al. 2014).

Q-FISH on menetelmä, jossa telomeerit värjätään telomeerispesifisellä väriaineella. Väriaineen avulla telomeerit saadaan näkyviksi soluissa, mikä mahdollistaa telomeerien pituuksien analyysin solu- ja jopa kromosomispesifisesti. Useita erilaisia Q-FISH-pohjaisia menetelmiä on kehitetty eri tarkoituksiin. PNA-FISH-menetelmässä telomeereihin sitoutuvana merkkiaineena käytetään fluoresoivia PNA-koettimia. Metafaasi-Q-FISH mahdollistaa telomeerien pituuksien analysointia kromosomispesifisesti, koska metafaasissa kukin kromosomi on mahdollista tunnistaa. Metafaasi-Q-FISH:ssä ei-telomeerinen DNA värjätään toisella väriaineella, mikä tekee kullekin kromosomille ominaisen raidoituksen näkyväksi. Metafaasi-Q-FISHillä on mahdollista havaita myös kromosomit, joissa telomeerit ovat kuluneet loppuun. Metafaasi Q-FISH soveltuu itsestäänselvästi vain mitoottisesti aktiivisten solujen tutkimukseen, ja se on työläs, paljon asiantuntemusta vaativa metodi. Vähemmän työläs interfaasi-Q-FISH soveltuu myös mitoottisesti inaktiivisille soluille, kuten senesenteille soluille. Sen avulla telomeerejä voidaan analysoida soluspesifisesti, mutta sillä ei voi erottaa eri kromosomien telomeerejä toisistaan, eikä sillä voida havaita loppuun kuluneita telomeerejä. Flow-FISH on virtausytometriapohjainen Q-FISH-menetelmä, jossa suspensiossa olevat solut kulkevat detektorin läpi yksi kerrallaan. Eri solutyypit voidaan erottaa toisistaan niille ominaisten fluoresenssisignaalien avulla, ja kuten muissakin Q-FISH-menetelmissä, telomeerien pituuksien analysoinnin mahdollistaa telomeereihin sitoutuvat fluoresoivat molekyylit (Montpetit et al. 2014).

Telomeerien G-häntien pituuksien analysointiin on myös kehitetty useita eri menetelmiä. Kaksijuosteiselle DNA:lle spesifistä, kuningasravusta peräisin olevaa DSN-nukleasia

hyödyntämällä kromosomi voidaan G-häntiä lukuunottamatta digestoida, mahdollistaen G-häntien pituuksien analysoinnin (Zhao et al. 2008).

6. Telomeerit ja ikääntyminen

Ikääntyminen on monimutkainen prosessi, jota ei vielä ymmärretä täysin, mutta telomeerien lyhenemisen aiheuttama senesenssi on nykykäsityksen mukaan osallinen. Leonard Hayflick havaitsi 60-luvulla ihmisen somaattisten solujen jakautumiskapasiteetin olevan rajallinen. Hän ehdotti, että tämä replikaatiivinen senesenssi voisi olla yhteydessä ikääntymiseen (Shay & Wright 2000). 70-luvun alussa Aleksei Olovnikov ehdotti, että telomeerien epätäydellinen kopioituminen voisi olla mekanismi replikaatiivisen senesenssin taustalla (Olovnikov 1996).

Nykyään telomeerien lyhenemistä pidetään yhtenä ikääntymisen taustalla vaikuttavista tekijöistä. Somaattisten solujen telomeerit lyhenevät tunnetusti iän myötä kromosomin päiden kopioimisongelman sekä oksidatiivisen stressin seurauksena, ja lyhyiden telomeerien on havaittu korreloivat useiden ikääntymiseen liittyvien sairauksien, kuten sydän- ja verisuonitaudin ja Alzheimerin taudin kanssa (Herrmann et al. 2018).

Vaikka somaattisissa kantasoluissa ekspressoidaan telomeraasia, se ei niissä riitä estämään telomeerien lyhenemistä (Shay & Wright 2010). Telomeerien replikaatiivinen lyheneminen johtaa senesenttien solujen osuuden kasvamiseen kudoksissa ja kudosten uusiutumiskyvyn heikkenemiseen. Yhdessä ajan myötä kertyvien geneettisten ja epigeneettisten muutoksien kanssa tämä lopulta häiritsee elimistön normaalia toimintaa ja aiheuttaa ikääntymiseen liittyviä terveysongelmia.

Toinen mahdollinen mekanismi, jolla telomeerien lyheneminen voi aiheuttaa ikääntymistä, liittyy pitkien telomeerien mahdolliseen rooliin geeniekspression säätelijänä. Pitkä telomeeri ylettää vuorovaikuttamaan genomisen DNA:n kanssa, ja voisi siten vaikuttaa geeniekspressioon. Telomeerin lyhetessä mahdollinen vuorovaikutus heikkenee, tai jopa loppuu, millä voisi olla ikääntymiseen liittyviä sairauksia lisäävä vaikutus (Shay 2018).

7. Telomeerit ja syöpä

Replikatiivisen senesenssin kiertäminen telomeraasin aktivoitumisen avulla on hyvin yleinen piirre syöpäsoluissa. Normaalissa somaattisessa kudoksessa telomeraasin käänteiskopioijan, TERT:n, ekspressioita ei tapahdu merkittävästi. TERT:n ekspression uskotaan olevan senesenssin kiertämisen kannalta tärkein säätelykohta. TERT-promoottorin mutaatiot ja monistumiset ovat yleisiä syövän piirteitä. Promoottorin hypermetylaation on myös havaittu olevan yleistä syöpäsoluissa, mikä vaikuttaa ristiriitaiselta sen kanssa, että yleensä promottorialueiden metylaatiolla on geenin ekspressiota vähentävä vaikutus (McKelvey et al. 2020).

Lyhyiden telomeerien ylläpitoon vaaditaan vain vähän telomeraasia, ja useimmilla syöpäsoluilla onkin hyvin lyhyet telomeerit. Selektiivinen etu on syöpäsoluilla, jotka ekspressoivat vain sen verran telomeraasia, että lyhyet telomeerit eivät pääse lyhenemään kriittisen lyhyeksi. Luultavasti suuremmasta telomeraasin ekspressiosta ei ole syöpäsolulle hyötyä (Shay & Wright 2010). TERT:llä voi tosin olla telomeerien pituuden ylläpidon lisäksi myös muita onkogeenisia vaikutuksia. Tätä tukee se, että TERT:n yliekspression on havaittu lisäävän myös hiirien solujen onkogeneesiä, vaikka hiirillä telomeerien replikatiivista lyhenemistä ei tapahdu (Artandi et al. 2002).

Kaikki syövät eivät tarvitse telomeerien ylläpitoon telomeraasia, vaan ne hyödyntävät homologiseen rekombinaatioon perustuvaa ALT-mekanismia. Toisin kuin telomeraasipositiivisissa syövässä, joissa on yleensä normaalia lyhyemmät telomeerit, ALT-positiivisissa kasvaimissa telomeerien pituus on hyvin heterogeenistä (Bryan et al. 1995). Muita ALT-spesifisiä piirteitä ovat ekstrakromosomaaliset telomeerirenkaat, sekä ALT-spesifiset, telomeereista, shelteriinistä, sekä DNA:n rekombinaatiossa toimivista proteiineista koostuvat PML-rakenteet tumassa (Zhao et al. 2019).

Yleisesti on pidetty faktana sitä, että 85-90 % syövästä käyttää telomeerien ylläpitoon telomeraasia, ja 10-15 % ALT-mekanismia, mutta Barthel et al. (2017) havaitsivat tutkimuksessaan telomeraasipositiivisten kasvainten osuuden olevan 73 %, ALT:n osuuden olevan vain 5 %, ja jäljelle jäävä 22 % kasvaimista ei vaikuttanut käyttävän kumpaakaan mekanismia. He ehdottivat, että telomeerien ylläpitoon voi riittää niin pieni määrä telomeraasia, että sen ekspressiota ei voida havaita, tai että on olemassa vielä toistaiseksi tuntemattomia

telomeerien ylläpitomekanismeja, ja siksi 22 %:ssa tutkituista kasvaimista ei voitu havaita telomeraasi- tai ALT-aktiivisuutta. Prognoosin kannalta ALT:lla ja telomeraasilla on erilaisia vaikutuksia eri syöpätyypeissä. Pehmytkudoksien sarkoomissa ALT-aktiivisuus on huonon prognoosin merkki, osteosarkoomissa ALT- ja telomeraasipositiivisuuden välillä paranemistodennäköisyydessä ei ole eroa, ja glioblastoomista ALT-positiivisten kasvaimien paranemismahdollisuudet ovat paremmat kuin telomeraasipositiivisten (Zhao et al. 2019).

Ikääntyneillä ihmisillä on tunnetusti lisääntynyt riski sairastua syöpään. Syövän yleistyminen vanhetessa selittyy ajan myötä kertyvien mutaatioiden avulla, mutta vaikuttaisi loogiselta, että myös ikääntyneiden ihmisten lyhyiden telomeerien aiheuttama genominen epästabiilius lisäisi syöpäriskiä. Lyhyet telomeerit eivät kuitenkaan vaikuta korreloivan syöpäriskin kanssa, kun ikä ja muut tunnetut syöpäriskiä lisäävät tekijät otetaan huomioon (Savage et al. 2013). Ihmiset, joilla telomeerit ovat tavallista pidemmät, ovat normaalia alttiimpia ainakin joillekin syöpätyypeille (Shen et al. 2011, Lan et al. 2013, Julin et al. 2015), mikä ei ole yllättävää, sillä pitkätelomeeriset solut voivat jakautua pidempään ennen kuin ne menevät senesenssiin, ja siten niillä on suurempi todennäköisyys immortalisoitua ja muuttua syöpäsoluiksi.

7.1. Telomeerit ja telomeerien ylläpitomekanismit syöpähoitojen kohteena

Telomeerien ylläpito on syöville välttämätöntä replikaatiivisen senesenssin välttämiseksi ja rajattoman jakautumisen mahdollistamiseksi. Ilman telomeraasia tai ALT-mekanismia hallitsemattomasti jakautuvat solut kuluttavat telomeerinsa nopeasti loppuun ja menevät senesenssiin tai kuolevat. Syövän riippuvuus telomeerien ylläpitomekanismeista on lupaava kohde syöpähoitojen kehityksen kannalta. Telomeereihin vaikuttavia syöpähoitoja on tutkittu jo pitkään, mutta yksikään hoito ei vielä ole edennyt kliinisiä kokeita pidemmälle.

Imetelstat on telomeraasi-inhibiittori, joka koostuu tiofosforamidaattirungosta ja siihen kiinnittyneistä nukleotideista, jotka muodostavat RNA-komponentin templaattisekvenssille vastinjuosteen. Lisäksi molekyylissä on kiinni palmitoyyli-lipidiosa. Imetelstat toimii kiinnittymällä templaattiosaan, estäen telomeraasin kiinnittymisen telomeeriin. Tiofosforamidaattirunko antaa imetelstatille useita hyödyllisiä kemiallisia ominaisuuksia, kuten korkean vesiliukoisuuden, stabiiliuden ja nukleasiresistenssin. Imetelstatin lipidiosa taas auttaa molekyylin siirtymistä solun sisään, sen pysymistä solussa (Jafri et al. 2016). Imetelstat

on havaittu toimivaksi telomeraasi-inhibiittoriksi useissa eri syöpätyypeissä (Marian et al. 2009, Burchett et al. 2014, Hu et al. 2015).

Imetelstatia on tutkittu kliinisissä kokeissa jo useiden vuosien ajan. Osa kokeista on jo saatu päätökseen, osa on vielä meneillään, ja osa on keskeytetty hematologisen myrkyllisyyden vuoksi. Yksi ongelma Imetelstatissa on se, että sitä tulee käyttää pitkäaikaisesti, jotta telomeerien replikatiivisella lyhenemisellä on vaikutusta syöpään. Imetelstatin pitkäaikaisen käytön mahdollisten haittavaikutuksien välttämiseksi tulisi potilaan pitää taukojaksoja Imetelstatin käytössä, minkä seurauksena syöpäsolujen telomeerit pääsisivät taas kasvamaan (Jafri et al. 2016). Terveiden telomeraasipositiivisten kantasolujen ja ituradan solujen telomeerit ovat yleensä syöpäsolujen telomeereja pidemmät, minkä takia telomeraasi-inhibiittorien vaikutus terveiden solujen jakautumiskykyyn ei ole yhtä merkittävä (Shay & Wright 2010).

Useita erilaisia syöpäsolujen telomeraasipositiivisuutta hyödyntäviä telomeraasirokotteita on tällä hetkellä kliinisissä kokeissa, mutta yksikään ei ole vielä käytössä. Telomeraasirokotteet perustuvat siihen, että telomeraasia ekspressoivissa syöpäsoluissa syntyy telomeraasin hajotuksen myötä telomeraasifragmentteja, jotka ovat immuunisysteemin tunnistettavissa solun pinnalta. Opettamalla immuunisysteemin solut tunnistamaan telomeraasin, immuunisysteemi voidaan valjastaa hyökkäämään telomeraasipositiivisia soluja vastaan.

GV1001 on TERT:n aktiivista kohtaa vastaavasta peptidistä ja adjuvantista koostuva telomeraasirokote. GV1001 vaikuttaa kliinisten kokeiden tulosten perusteella toimivalta syöpärokotteelta ainakin haimasyöpää (Bernhardt et al. 2006), eturauhassyöpää (Thoma 2018) ja NSCLC-tyyppisiä keuhkosityöpiä vastaan (Brunsvig et al. 2006), mutta hepatosellulaariseen karsinomaan sillä ei vaikuta olevan huomattavaa vaikutusta (Greten et al. 2010). Muita kliinisissä tutkimuksissa parhaillaan olevia telomeraasin vastaisen immunitetin luovia peptidirokotteita ovat Vx-001, UV1, ja GX301 (Mizukoshi & Kaneko 2019).

Toinen lähestymistapa TERT:n vastaisen immunitetin luomiseen on se, että APC-solut saadaan ekspressoimaan TERT:ä tai sen osaa. Kliinisissä kokeissa parhaillaan oleva GRNVAC1 toimii siten, että potilaan dendriittisoluihin transduktoidaan TERT-LAMP1-kimeeriproteiinia koodaavaa mRNA:ta ex vivo, ja sitten injektoidaan potilaan kehoon. LAMP1

lokalisoi kimeeriproteiinin lysosoimeihin hajotettavaksi osiin, mikä mahdollistaa polyklonaalisen immuunivasteen telomeraasia vastaan (Mizukoshi & Kaneko 2019).

Syövän telomeraasipositiivisuutta voidaan hyödyntää syövän hoidossa myös muilla tavoin. 6-tiodeoksiguanosiini on deoksiguanosiinia vastaava molekyyli, jossa guaniinin 6-hiileen kiinnittynyt happi on korvautunut rikillä. 6-tio-2'-deoksiguanosiinista tehdään solussa 6-tiodeoksiguanosiinitrifosfaattia, jota telomeraasi voi käyttää telomeerien synteesissä guanosinitrifosfaatin sijasta. Osa uusien telomeeritoistojaksojen dGTP:stä korvautuu 6-tio-dGTP:llä, mikä johtaa DNA-vauriosignaaleihin ja apoptoosiin, koska poikkeava nukleosidi estää shelteriini-kompleksin normaalin rakenteen muodostumisen. 6-tio-dG:llä on havaittu telomeraasipositiivisia soluja tappava vaikutus. 6-tio-dGTP:tä päätyy DNA:han lähinnä telomeraasin toiminnan seurauksena, ja siksi 6-tio-dG ei vahingoita telomeraasinegatiivisia soluja (Mender et al. 2014).

Telomeereissa yleisiä G-kvadrupleksirakenteita on myös mahdollista hyödyntää syövän torjunnassa. G-kvadrupleksit telomeerien G-hännissä voivat häiristä sekä telomeraasin toimintaa, että telomeerien päiden suojausta inhiboimalla shelteriinin alayksiköiden sitoutumista telomeereihin (Tahara et al. 2006). Tämän takia G-kvadruplekseja stabiloivat molekyylit, kuten telomestatin, voisivat toimia syöpähoitona. Telomestatinilla on havaittu telomeereja lyhentävä ja syöpäsoluja tuhoava vaikutus (Tahara et al. 2006, Tauchi et al. 2006). Telomestatin ei vaikuta terveisiin, telomeraasinegatiivisiin soluihin yhtä voimakkaasti, kuin syöpäsoluihin, mikä viittaa siihen, että T-silmukoiden stabiiliudessa voi olla eroja syöpäsolujen ja terveiden solujen välillä (Tahara et al. 2006). Toinen syöpähoitojen näkökulmasta tutkittu G-kvadruplekseja stabiloiva molekyyli on BRACO-19 (Burger et al. 2005).

Telomeerien G-kvadruplekseja voidaan hyödyntää syöpäsolujen tuhoamisessa myös käyttäen molekyylejä, jotka pilkkovat DNA:ta G-kvadruplekseen kohdalta. Tällainen ominaisuus on eräillä naftaleenidiimiinistä muokatuilla kuparikomplekseilla. Näillä komplekseilla on havaittu olevan huomattava telomeereja lyhentävä vaikutus syöpäsoluille (Yu et al. 2019). Terveiden solujen telomeereja ne eivät lyhennä yhtä paljoa, koska G-kvadruplekseja muodostuu eniten solusyklin S-faasissa, eli G-kvadruplekseja on useammin syöpäsoluissa niiden nopean jakautumisen takia.

Myös ALT-mekanismiin kohdistuvia syöpähoitoja on tutkittu. ATR-kinaasilla on rooli homologisessa rekombinaatiossa, ja ATR-inhibiittoreilla on havaittu olevan ALT-mekanismia häiritsevä vaikutus. ATR:ää inhiboivat VE-821 ja ATR siRNA aiheuttavat ALT-soluissa kromosomien fragmentaatiota ja apoptoosia (Flynn et al. 2015). ALT-soluille on ominaista kromatiinia organisoivan ATRX:n inaktivoituminen. ATRX toimii myös synnynnäisten antiviraalisten immuunivasteiden muodostamisessa. Tätä voisi mahdollisesti käyttää hyväksi syöpähoidoissa. Viruksia, jotka eivät voi toimia ATRX-positiivisissa soluissa, voisi käyttää yksinomaan ALT-positiivisten solujen tuhoamiseen (Han et al. 2019). ATRX vaikuttaa toimivan myös DNA-katkosten korjauksessa, ja ATRX-negatiivilla soluilla on heikentynyt DNA-vauroiden korjauskyky. ALT-positiivisia syöpiä voisi ehkä myös hoitaa DNA-vaurioita aiheuttamalla, sillä DNA-vauriot ovat ALT-soluille kohtalokkaampia kuin terveille soluille (Juhász et al. 2018).

Kirjallisuusviitteet

Artandi S. E., Alson S., Tietze M. K., Sharpless N. E., Ye S., Greenberg R. A., Castrillon D. H., Horner J. W., Weiler S. R., Carrasco R. D. & DePinho R. A. (2002) Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in aging mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(12): 8191-6.

Asamitsu S., Obata S., Yu Z., Bando T. & Sugiyama H. (2019) Recent Progress of Targeted G-Quadruplex-Preferred Ligands Toward Cancer Therapy. *Molecules* 24, 429.

Bathel F. P., Wei W., Tang M., Martinez-Ledesma E., Hu X., Amin S. B., Akdemir K. C., Seth S., Song X., Wang Q., Lichtenberg T., Hu J., Zhang J., Zheng S. & Verhaak R. G. W. (2017) Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types. *Nature Genetics* 49(3): 349-357.

Bernharft S. L., Gjertsen M. K., Meller S. T., Eriksen J. A., Meo M., Buanes T. & Gaudernack G. (2016) Telomerase peptide vaccination of patients with non-resectable pancreatic cancer: a does escalating phase I/II study. *British Journal of Cancer* 95 1474-1482.

Biffi G., Tannahill D., McCafferty J. & Balasubramanian S. (2013) Quantitative Visualization of DNA G-quadruplex Structures in Human Cells. *Nature Chemistry* 5(3): 182-186.

Blackburn E. H., Epel E. S. & Lin J. (2015) Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science* volume 350, issue 6265, 1193-8.

Brunsvig P. F., Aamdal S., Gjertsen M. K., Kvalheim G., Markowski-Grimsrud C. J., Sve I., Dyrhaug M., Trachel S., Møller M., Eriksen J. A. & Gaudernack G. (2005) Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunology Immunotherapy* 55: 1553-1564.

Bryan T. M., Englezou A., Gupta J., Bacchetti S. & Reddel R. R. (1995) Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *The EMBO Journal* vol 14, no. 17, pp.4240-4248.

Burchett K. M., Yan Y. & Oullette M. M. (2012) Telomerase Inhibitor Imetelstat (GRN163L) Limits the Lifespan of Human Pancreatic Cancer Cells. *PLOS One* 9(1) e85155.

Burger A. M., Dai F., Schultes C. M., Reszka A. P., Moore M. J., Double J. A. & Neidle S., (2005) The G-Quadruplex-Interactive Molecule BRACO-19 Inhibits Tumor Growth, Consistent with Telomere Targeting and Interference with Telomerase Function. *Cancer Research* 65: (4), p. 1489-1496.

Cesare A. J. & Reddel R. R. (2010) Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nature Reviews Genetics* vol.11 (5), p.319-330.

Chai W., Du Q., Shay J.W. & Wright W. E. (2006) Human Telomeres Have Different Overhang Sizes at Leading versus Lagging Strands. *Molecular Cell* volume 21, issue 3, pages 427-435.

Chen L., Redon S. & Ligner J. (2012) The human CST complex is a terminator of telomerase activity. *Nature* 488 pages 540-544.

Chow T. T., Zhao Y., Mak S. S., Shay J. W. & Wright W. E. (2012) Early and late steps in telomere overhang processing in normal human cells: the position of the final RNA primer drives telomere shortening. *Genes & Development* 26:1167–1178.

Crossley M. P., Bocek M. & Cimprich K. A. (2019) R-loops as cellular regulators and genomic threats. *Molecular Cell* 73(3): 398–411.

Dai X., Huang C. & Chai W. (2012) CDK1 differentially regulates G-overhang generation at leading- and lagging-strand telomeres in telomerase-negative cells in G2 phase. *Cell Cycle* 11:16, 3079-3086.

de Lange, T. (2018) Shelterin-mediated telomere protection. *Annual review of genetics* 52:223–47.

Feng X., Hsu S., Kasbek C., Chaiken M. & Price C. M. (2016) CTC1-mediated C-strand fill-in is an essential step in telomere length maintenance. *Nucleic Acids Research* vol 45, no. 8, 4281-4293.

Flynn R. L., Cox K. E., Jeitany M., Wakimoto H., Bryll A. R., Ganem N. J., Bersani F., Pineda J. R., Suvà M. L., Benes C. H., Haber D. A., Boussin F. D. & Zou L. (2015) Alternative Lengthening of Telomeres Renders Cancer Cells Hypersensitive to ATR Inhibitors. *Science* 347(6219); 273-277.

Gorbunova V. & Seluanov A. (2009) Coevolution of telomerase activity and body mass in mammals: From mice to beavers. *Mechanisms of Aging and Development* 130(0): 3–9.

Graf M., Bonetti D., Lockhart A., Jolivet P., Teixeira M. T. & Luke B. (2017) Telomere Length Determines TERRA and R-Loop Regulation through the Cell Cycle. *Cell* 170, 72–85.

Greten T. F., Forner A., Korangy F., N.Kontchou G., Barget N., Ayuso C., Ormandy L. A., Manns M. P., Beauregard M. & Bruix J. (2010) A phase II open label trial evaluating safety and efficacy of a telomerase peptide vaccination in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 10:209.

Herrmann M., Pusceddu I., März W. & Herrmann W. (2018) Telomere biology and age-related diseases. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 56(8): 1210-1222.

Hu Y., Bobb D., He J., Hill D. A. & Dome J. S. (2015) The HSP90 inhibitor alvespimycin enhances the potency of telomerase inhibition by imetelstat in human osteosarcoma. *Cancer Biology & Therapy* 16(6): 949-957.

Ishikawa F. & Naito T. (1999) Why do we have linear chromosomes? A matter of Adam and Eve. *Mutation Research/DNA Repair* volume 434, issue 2, pages 99-107.

Jafri M. A., Ansari S. A., Algahtani M. H. & Shay J. W. (2016) Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Medicine* 8: 69.

Juhász S., Elbakry A., Mathes A. & Löbrich M. (2018) ATRX Promotes DNA Repair Synthesis and Sister Chromatid Exchange during Homologous Recombination. *Molecular Cell* vol 71, issue 1.

Julin B., Shui I., Heaphy C. M., Joshu C. E., Meeker A. K., Giovannucci E., De Vivo I. & Platz E. A. (2015) Circulating leukocyte telomere length and risk of overall and aggressive prostate cancer *British Journal of Cancer* 112, 769-776.

Han M., Napier C. E., Frölich S., Teber E., Wong T., Noble J. R., Choi E. H. Y., Everett R. D., Cesare A. J. & Reddel R. R. (2019) Synthetic lethality of cytolytic HSV-1 in cancer cells with ATRX and PML deficiency. *Journal of Cell Science* 132(5).

Lan Q., Cawthon R., Gao Y., Hu W., Hosgood D. III, Barone-Adesi F., Ji B., Bassig B., Chow W., Shu X., Cai Q., Xiang Y., Berndt S., Kim C., Chanock S., Zheng W. & Rothman N. (2013), Longer Telomere Length in Peripheral White Blood Cells Is Associated with Risk of Lung Cancer and the rs2736100 (CLPTM1L-TERT) Polymorphism in a Prospective Cohort Study among Women in China. *PLOS One* vol 8, issue 3.

Marian C. O., Woodring E. W. & Shay J. W. (2009) The effects of telomerase inhibition on prostate tumor-initiating cells. *International Journal of Cancer* vol 126, issue 2, p. 321-331.

McKelvey B. A., Zeiger M. A. & Umbricht C. B. (2020) Exploring the epigenetic regulation of telomerase reverse transcriptase (TERT) in human cancer cell lines. *Molecular Oncology* 14, 2355-2357.

Mender I., Gryaznov S., Dikmen Z. G., Wright W. E. & Shay J. W. (2014), Induction of Telomere Dysfunction Mediated by the Telomerase Substrate Precursor 6-Thio-2'-Deoxyguanosine. *Cancer Discovery* 5(1):82-95.

Mizukoshi E. & Kaneko S. (2019) Telomerase-Targeted Cancer Immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences* 20(8): 1823.

Montpetit A. J., Alhareeri A. A., Montpetit M., Starkweather A. R., Elmore L. W., Filler K.,

Mohanraj L., Burton C. W., Menzies V. S., Lyon D. E., Collins J. B., Teefey J. M. & Jackson-Cook, V. K. (2014) Telomere Length: A Review of Methods for Measurement. *Nursing research* volume 63, pages 289-299.

Nakahishi C. & Seimiya H. (2020) G-quadruplex in cancer biology and drug discovery. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 531, 45-50.

Nguyen T. H. D., Tam J., Wu R. A., Greber B. J., Toso D., Nogales E. & Collins K. (2018) Cryo-EM structure of substrate-bound human telomerase holoenzyme. *Nature* 557(7704): 190–195.

Olovnikov A. (1996) Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Experimental Gerontology* vol. 31, no. 4, pages 443-448.

Price C. M., Boltz K. A., Chaiken M. F., Stewart J. A., Beilstein M. A. & Shippen D. E. (2010) Evolution of CST function in telomere maintenance. *Cell Cycle* 9:16, 3157-3165.

Savage S. A., Gadalla S. M. & Chanock S. J. (2013) The Long and Short of Telomeres and Cancer Association. *Journal of The National Cancer Institute* vol. 105, issue 7.

Sfeir A. J, Chai W., Shay J. W. & Wright W. E. (2005) Telomere-End Processing: the Terminal Nucleotides of Human Chromosomes. *Molecular Cell* vol 18, issue 1, 131-138.

Smith E. M., Pendlebury D. F. & Nandakumar J. (2020) Structural biology of telomeres and telomerase. *Cellular and Molecular Life Sciences* January 77(1): 61–79.

Shay J. W. (2018) Telomeres and aging. *Current Opinion in Cell Biology* 52: 1-7.

Shay J. W. & Wright W. E. (2000) Hayflick, his limit and cellular ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1, 72-76.

Shay J. W. & Wright W. E. (2010) Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells. *FEBS Letters* 584(7): 3819-3825.

Shen M., Cawthon R., Rothman N., Weinstein S. J., Virtamo J., Hosgood H. D. III, Lim U., Albanes D. & Lan Q. (2011) A Prospective Study of Telomere Length Measured by Monochrome Multiplex Quantitative PCR and Risk of Lung Cancer. *Lung Cancer* 73(2); 133-137.

Tahara H., Shin-ya K., Seimiya H., Yamada H., Tsuruo T. & Ide T. (2006) G-Quadruplex stabilization by telomestatin induces TRF2 protein dissociation from telomeres and anaphase bridge formation accompanied by loss of the 3' telomeric overhang in cancer cells. *Oncogene* 25, 1955-1966.

Tauchi T., Shin-ya K., Sashida G., Sumi M., Okabe S., Ohyashiki J. H. & Ohyashiki K. (2006) Telomerase inhibition with a novel G-quadruplex-interactive agent, telomestatin: in vitro and in vivo studies in acute leukemia. *Oncogene* 25, 5719-5725.

Thoma C., (2018) Signal of GV1001 efficacy. *Nature Reviews Urology* 15, 466-467.

Timashev L. A. & de Lange T. (2020) Characterization of t-loop formation by TRF2. *Nucleus* vol 11, no. 1, 164–177.

Turner K. J., Vasu V. & Griffin D. K. (2019) Telomere biology and human phenotype. *Cells* 8, 73.

Wang Y. & Feigon J. (2017) Structural biology of telomerase and its interaction at telomeres. *Current Opinion in Structural Biology* 47: 77–87.

Wu Y., Shin-ya K. & Brosh R. M. Jr (2008) FANCD1 Helicase Defective in Fanconi Anemia and Breast Cancer Unwinds G-Quadruplex DNA To Defend Genomic Stability. *Molecular and Cellular Biology* vol 28, no 12, pages 4116-4128.

Yu Z., Fenk K. D., Huang D., Sen S. & Cowan J. A. (2019) Rapid Telomere Reduction in Cancer Cells Induced by G-Quadruplex-Targeting Copper Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry* 62, 10, 5040-5048.

Zhao Y., Hoshiyama H., Shay J. W. & Wright W. E (2008) Quantitative telomeric overhang determination using a double-strand specific nuclease. *Nucleic Acids Research* vol. 36, no. 3.

Zhao S., Wang F. & Liu L. (2019) Alternative Lengthening of Telomeres (ALT) in Tumors and Pluripotent Stem Cells. *Genes* 10, 1030.